

Aus der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie
der Haustiere mit Ambulatorium
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. M. Berchtold)

Arbeit unter der Leitung von Dr. U. Gassmann

**PROTEINE IN DEN UTERUSSEKRETEN VON KÜHEN
MIT UND OHNE ENDOMETRITIS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
URS RUFENER
Tierarzt
von Sigriswil (BE) und Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. M. Berchtold, Referent
Prof. Dr. K. Zerobin, Korreferent

Zürich 1985
Zentralstelle der Studentenschaft

Aus der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie
der Haustiere mit Ambulatorium
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. M. Berchtold)

Arbeit unter der Leitung von Dr. U. Gassmann

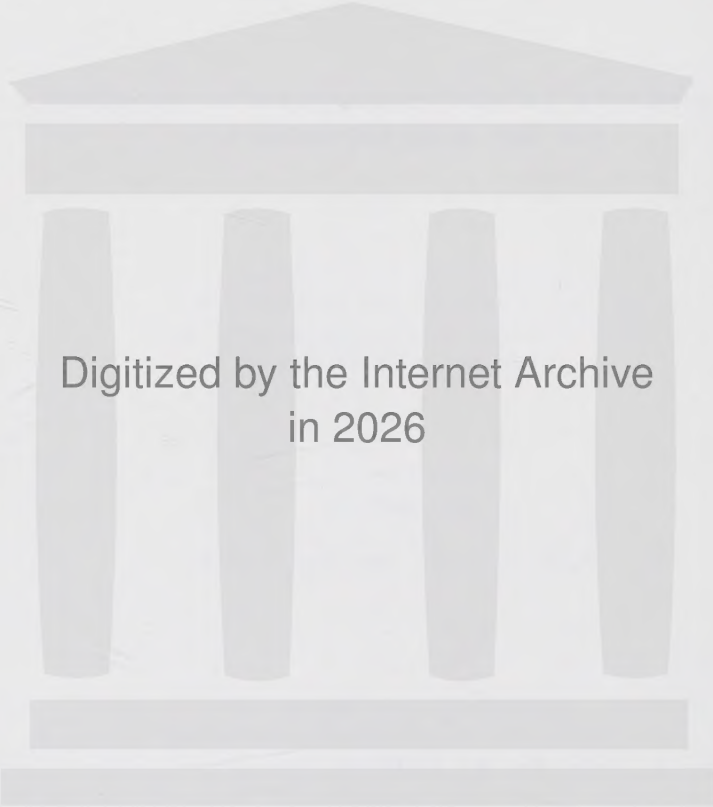
PROTEINE IN DEN UTERUSSEKRETEN VON KÜHEN MIT UND OHNE ENDOMETRITIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
URS RUFENER
Tierarzt
von Sigriswil (BE) und Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. M. Berchtold, Referent
Prof. Dr. K. Zerobin, Korreferent

Zürich 1985
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507201_0033

meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURBESPRECHUNG	3
	A. Untersuchungen der uterinen Sekrete gesunder Tiere	3
	B. Untersuchungen an Tieren mit Endometritis	4
III	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	8
	A. Material und Versuchsanordnung	8
	B. Methoden	9
	C. Resultate	12
IV	DISKUSSION	26
V	ZUSAMMENFASSUNG	30
VI	LITERATURVERZEICHNIS	31

I EINLEITUNG

Die Wirtschaftlichkeit der Rindviehhaltung ist in hohem Mass abhängig von der Fruchtbarkeit der Tiere. Unter den mannigfaltigen Ursachen für eine reduzierte Fruchtbarkeit ist die chronische Endometritis von grosser Bedeutung: Man nimmt an, dass in mehr als der Hälfte aller Fälle von Umrindern eine eitrige Entzündung des Endometriums vorliegt (18a).

Die klinische Diagnose der Endometritis bereitet oft Schwierigkeiten. Nur in seltenen Fällen führt die Endometritis zu rektal spürbaren Veränderungen am Uterus. Die vaginale Untersuchung erlaubt lediglich die Diagnose "Genitalkatarrh". Ob die Sekrete aus Vagina, Zervix oder Uterus stammen, ist häufig nicht eindeutig feststellbar. Leichtgradige Endometritiden ohne sichtbaren Ausfluss werden nicht erkannt. Umgekehrt beträgt der Anteil falsch positiver klinischer Diagnosen etwa ein Drittel (26). Zur Objektivierung der klinischen Diagnose ist daher die Untersuchung von Probenmaterial nötig, das direkt aus dem Uterus entnommen worden ist.

Mit speziellen Biopsiegeräten wie dem Biopsiekatheter von MILLER (28) können Gewebeproben für die histologische Untersuchung gewonnen werden. Diese Methode ist relativ aufwendig, und die Aussagekraft ist beschränkt, da das entnommene Gewebestück nicht repräsentativ sein muss für den Zustand des gesamten Endometriums (26). Zudem werden sekretorische Vorgänge nur ungenügend erfasst.

Eine einfachere Methode mit guter Aussagekraft ist die zytologische Untersuchung von Schleimhautabstrichen, die mit dem Folmer-Nielsen-Katheter aus dem Uterus entnommen werden (16). Der Nachweis von Entzündungszellen lässt auf das Vorliegen einer Endometritis schliessen; die Menge der Leukozyten und das Ausmass der Epithelzelldegeneration erlauben eine grobe Einteilung in leicht-, mittel- und hochgradige Endometritiden. Diese Ergebnisse genügen den Anforderungen in der Praxis vollumfänglich.

Für wissenschaftliche Arbeiten ist die Diagnostik jedoch nach wie vor unbefriedigend. Die Interpretation der Schleimhautabstriche ist abhängig von der Qualität der Abstriche und von der subjektiven Beurteilung durch den Untersuchenden. Ein quantitativer Parameter, der eine objektive Aussage über den Grad einer Endometritis erlaubt, fehlt.

Hier könnten Untersuchungen über die Beschaffenheit der Uterussekrete weiterhelfen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der quantitativen und qualitativen Analyse der Proteine in den Uterussekreten. Dabei interessieren speziell folgende Fragen:

- a) Wie ändert sich der Proteingehalt im Uterussekret
 - bei Kühen mit gesundem Endometrium im Verlauf des Zyklus?
 - Bei Kühen mit Endometritis?
- b) Welche Proteinfractionen kommen hauptsächlich vor?
Ändern sich ihre Anteile
 - im Verlauf des Zyklus?
 - im Verlauf einer Endometritis?
- c) Kann mittels dieser Parameter eine Aussage getroffen werden über den Grad einer Endometritis? Bestehen Beziehungen zwischen den proteinanalytischen Ergebnissen und den klinischen beziehungsweise zytologischen Befunden?
- d) Eignet sich die angewandte Methode für eine quantitative Endometritisdiagnostik?

II LITERATURÜBERSICHT

A. Untersuchungen der uterinen Sekrete gesunder Tiere

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich eine Vielzahl von Autoren mit den uterinen Sekreten befasst. Ein ungestörtes uterines Milieu gilt als entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle und für die Ernährung der Frucht bis zu deren Implantation. Entzündungsvorgänge im Endometrium sind die wohl wichtigste Ursache für die Störung des uterinen Milieus. Neben den Elektrolyten, Lipiden, Kohlenhydraten und zelligen Bestandteilen sind es vor allem die Proteine, die im Zentrum des Interesses stehen.

Die Proteine im Uterussekret können eingeteilt werden in solche, die aus dem Blut in den Uterus gelangen, und in solche, die vom Endometrium gebildet und ins Uteruslumen sezerniert werden. Die ersteren sind somit Serumproteine; die letzteren bezeichnet man als spezifische oder sekretorische Proteine.

In Art, Menge und Vorkommen der Proteine bestehen grosse tierartliche Unterschiede. Bei wenigen Arten fand man spezifische Proteine in grösseren Mengen. Hierzu gehört das Kaninchen. Das spezifische Protein wird als Blastokinin oder Uteroglobulin bezeichnet; es macht bis zu 50 Prozent der gesamten Proteinmenge in den uterinen Sekreten aus (3, 5).

Das Rind gehört zu den Tierarten, bei welchen spezifische uterine Proteine zwar nachweisbar sind; ihr Anteil am Gesamteiweiss beträgt aber höchstens zwei Prozent (31). DIXON und GIBBONS (12) fanden neun verschiedene spezifische Proteine beim Rind.

Wesentliches Merkmal der sekretorischen Proteine ist ihre Hormonabhängigkeit. Sie können nur in der Progesteronphase des Zyklus nachgewiesen werden, ebenso während der Frühgravidität und bei kastrierten Tieren, welche mit Progesteron behandelt werden (3, 4, 5, 34).

Die Bedeutung der spezifischen Proteine ist noch weitgehend

unklar. Als mögliche Funktionen werden genannt: antimikrobielle Aktivität (5, 12), Enzymwirkung (Proteasen, Proteaseinhibitoren, Glycosidasen) (5, 23, 30, 32), Carrier für Eisen und Steroidhormone (3), Spermienkapazitation (32), Regulierung der Entwicklung der Blastozyste und deren Implantation (3, 5, 11, 23).

Die Menge der Serumproteine im Uterussekret und die Anteile der einzelnen Proteine weichen von denjenigen im Blutserum ab und verändern sich zum Teil im Verlauf des Zyklus. Man nimmt daher an, dass aktive Transportmechanismen vorhanden sind, die unter hormoneller Kontrolle den Übertritt von Proteinen aus dem Blut ins Uteruslumen regulieren (5, 21, 34).

B. Untersuchungen an Tieren mit Endometritis

Weniger zahlreich sind die Arbeiten, welche sich mit Proteinen im Sekret von entzündlich veränderten Uteri befassen. Einige Autoren untersuchten in diesem Zusammenhang Material aus dem Uterus der Stute (1, 2, 7, 22, 25, 29, 36).

MITCHELL et al. (29) untersuchten Immunglobulinkonzentrationen von gesunden Stuten und solchen mit chronischer Endometritis und verglichen die Werte mit denjenigen des Blutserums. Sie fanden dabei signifikant höhere IgA-Werte im Uterus als im Serum. Im Verlauf des Zyklus hatten die Stuten höhere Gesamt-Immunglobulinwerte im Diöstrus als im Östrus. Die Stuten mit Endometritis wiesen signifikant mehr Immunglobuline, vor allem IgA und IgG, auf als gesunde Stuten. Keine Unterschiede fand man bei IgG(T) und IgM.

ASBURY et al. (2) bestimmten Immunglobuline von "resistenten" und "anfälligen" Stuten vor und nach der Inokulation des Uterus mit beta-haemolysierenden Streptokokken. Die anfälligen Stuten, bei denen es zu einer persistierenden Infektion kam, wiesen generell höhere Immunglobulin-Werte auf, sowohl vor als auch nach der Inokulation.

Höhere IgA- und IgG-Werte fanden auch LIU et al. (25) bei infizierten Stuten.

WILLIAMSON et al. (36) verglichen 20 Endometritisstuten mit 67 Kontrollstuten. Die IgA- und Proteinkonzentrationen waren signifikant höher bei der ersten Gruppe.

BLUE et al. (7) untersuchten neben der antibakteriellen Aktivität der uterinen Sekrete auch deren Gesamtprotein. Sie fanden ebenfalls einen markanten Anstieg des Proteingehaltes bei Stuten mit Endometritis.

Die Proteine im Uterussektret von Rindern mit symptomloser Sterilität haben LAMOTHE et al. (24) untersucht. Die Versuchskühe erfüllten folgende Bedingungen:

- bakterielle Untersuchung des Uterusschleims negativ
- serologisch negativ bezüglich Brucellen, Leptospiren und IBR
- klinisch keine Ursache für Infertilität erkennbar
- mindestens viermal vergeblich besamt

Symptomlose Sterilität darf nicht gleichgesetzt werden mit chronischer Endometritis; immerhin darf angenommen werden, dass zumindest ein Teil der Versuchskühe eine subklinische Endometritis als Ursache für die symptomlose Sterilität aufwies. Untersucht wurden Totalprotein, Albumin sowie Alpha-, Beta- und Gammaglobuline; die Werte wurden mit denjenigen von Kühen mit normaler Fruchtbarkeit verglichen. In beiden Gruppen liess sich eine Zyklusabhängigkeit erkennen: Albumin- und Globulinwerte waren am niedrigsten im Östrus, am höchsten im Postöstrus und im Diöstrus. Bei den Kühen mit symptomloser Sterilität zeigten die Werte generell eine grössere Variabilität zwischen den einzelnen Versuchstieren. Im Vergleich mit den Kontrolltieren waren der Totaleiweiss- und der Albumingehalt signifikant höher, allerdings nur während der Brunst. Keine wesentlichen Unterschiede gab es bei den drei Globulinfraktionen zwischen Versuchs- und Kontrollkühen.

Mehrere Autoren untersuchten Immunreaktionen im Zusammenhang mit *Campylobacter fetus*, einem spezifischen Deckinfektionserreger des Rindes (9, 10, 13, 35).

DUNCAN et al. (13) untersuchten die Immunglobuline im Serum und in diversen Körpersekreten einschliesslich dem Vaginalsekret von Rindern, die Kontakt mit *C. fetus* hatten (intra-

zervikale oder subkutane Inokulation). Während 12 Wochen wurden wöchentlich Proben entnommen und IgA, IgG, IgM sowie Albumin bestimmt. In allen Körpersekreten wurden höhere IgA-Werte gemessen als im Serum; am wenigsten deutlich war der Unterschied im Vaginalschleim. Nur hier waren die IgG- und die Albuminkonzentrationen höher als die IgA-Konzentrationen. IgM kam nur in sehr kleinen Mengen vor. In den Sekreten bestand zwischen IgA und Albumin keine Korrelation; dies interpretierten die Autoren als Beweis für die lokale Synthese von IgA und/oder das Vorhandensein von aktiven Transportmechanismen. Hingegen waren Albumin und IgG eng korreliert, was für einen nicht selektiven Übertritt beider Proteine vom Serum ins Vaginalsekret spricht.

WILKIE et al. (35) bestimmten Immunglobuline im Serum und im Zervicovaginalschleim nach aktiver und passiver parenteraler Immunisierung oder nach lokaler Inokulation mit C. fetus. Nach parenteraler Verabreichung fanden sie im Serum Agglutinine der IgG- und der IgM-Klasse, im Zervicovaginalschleim dagegen nur IgG. Die nach lokaler Inokulation gefundenen Agglutinine gehörten zur IgA-Klasse. Dass IgG im Vaginalsekret sowohl nach aktiver wie nach passiver Immunisierung vorkam, spricht für den Übertritt der Antikörper vom Blut in den Genitalschleim. Diese Transsudation ist aufgrund der Resultate offenbar viel weniger effizient bezüglich IgM, möglicherweise aufgrund des grösseren Molekulargewichtes dieser Antikörper. Die hohen IgA-Konzentrationen nach lokaler Inokulation sprechen für eine Synthese dieser Immunglobuline im Genitaltrakt.

Die lokale IgA-Produktion im Endometrium wurde von BUTLER et al. (8) in vitro mit Organkulturen nachgewiesen.

CORBEIL et al. (9) bestimmten in Verlaufsuntersuchungen die Immunglobulinkonzentrationen im Vaginalschleim von virginellen Färsen, die mit C. fetus infiziert worden waren. 1 bis 4 Wochen danach wurden spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen, 2 Wochen später IgA und nach weiteren 2 Wochen IgG. Vom Zeitpunkt der Erregerelimination an konnten spezifische IgG und IgM noch über mehrere Wochen nachgewiesen werden; IgA war länger als ein halbes Jahr nachweisbar. Sobald IgA gefunden werden konnte, war es in höheren Konzentrationen vorhanden als die anderen Antikörperklassen.

Weitere Untersuchungen von CORBEIL et al. (10) ergaben, dass Unterschiede bestehen zwischen den Immunglobulinkonzentrationen in Vagina und Uterus. 14 Tage nach der lokalen Inokulation mit *C. fetus*, sowie im weiteren Verlauf, war der dominierende Immunglobulin-Anteil im Uterus IgG, in der Vagina dagegen IgA.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Versuchsanordnung und Material

Die Untersuchungen gliederten sich in drei Versuchsgruppen:

- Versuch 1: Proteine im Uterussekret von gesunden Kühen im Verlauf des Zyklus
- Versuch 2: Proteine im Uterussekret von Kühen im Verlauf einer experimentellen Endometritis
- Versuch 3: Proteine im Uterussekret von Kühen mit chronischer Endometritis in Abhängigkeit vom Zyklus

Die Kühe für Versuch 1 und 2 stammten aus dem Lehrbetrieb der Klinik. Die Proben für Versuch 3 wurden bei Patienten der Ambulatorischen Klinik entnommen. Die Versuche erstreckten sich über den Zeitraum von Oktober 1983 bis Oktober 1984. Der Versuchsplan sah wie folgt aus:

- Versuch 1: 5 Versuchskühe. Probenentnahmen:
 - Probe 1/1 am Tag 0 (Brunst)
 - Probe 1/2 am Tag 4
 - Probe 1/3 am Tag 10
 - Probe 1/4 am Tag 16
 - Probe 1/5 etwa am Tag 21 (Brunst)
- Versuch 2: 5 Versuchskühe. Probenentnahmen:
 - Probe 2/1 am Tag 0 (Endometritisinduktion)
 - Probe 2/2 am Tag 1
 - Probe 2/3 am Tag 3
 - Probe 2/4 am Tag 6
 - Probe 2/5 am Tag 10

Die Endometritisinduktion erfolgte anschliessend an die Entnahme der Probe 2/1. Die Kühe waren zu diesem Zeitpunkt in der frühen Progesteronphase (4. bis 8. Zyklustag)

- Versuch 3: 2 x 10 Patientenkühe
 - 3a): 10 Kühe im Östrus oder im Proöstrus
 - 3b): 10 Kühe im Diöstrus

Die Kühe für Versuch 1 und 2 hatten folgende Anforderungen zu erfüllen:

- Sie mussten einen normalen Zyklus aufweisen.
- Die klinische und zytologische Untersuchung durfte keine Hinweise auf eine Endometritis geben.

Bei den Kühen für Versuch 3 musste die klinisch festgestellte Endometritis zytologisch bestätigt worden sein.

B. Methoden

1. Klinische Untersuchung

Vor jeder Probenentnahme wurden die Versuchskühe rektal sowie vaginal mit Hilfe eines Röhrenspekulums untersucht. Aufgrund der dabei erhobenen Befunde wurde das Zyklusstadium bestimmt und in Versuch 2 und 3 eine klinische Endometritisd Diagnose gestellt.

2. Probenentnahme

Die Uterussekrete wurden mit dem Katheter nach Folmer-Nielsen (18a) aus dem Corpus uteri entnommen. Der Katheter wurde gut verschlossen und das gewonnene Material innerhalb von 1 bis 3 Stunden verarbeitet.

3. Endometritis-Induktion (Versuch 2)

Unmittelbar nach der Entnahme der Probe 2/1 erfolgte die Infusion von 100 µg Coli-Endotoxin (Serotyp 026:B6) (Sigma, St. Louis, USA) in 50 ml physiologischer NaCl-Lösung ins Corpus uteri. Vorgängige Versuche hatten gezeigt, dass Endotoxine in dieser Dosierung eine akute Endometritis mit starker Leukozytenimmigration hervorrufen, die nach wenigen Tagen wieder abklingt. Dies war zu erwarten aufgrund der

analogen Wirkung der Endotoxine im Euter des Rindes (20, 27).

4. Verarbeitung der Uterussekrete

Der Inhalt des Folmer-Nielsen-Katheters wurde zuerst makroskopisch beurteilt bezüglich Menge, Konsistenz, Farbe und eventuellen Blutbeimengungen. Ein Teil des Inhalts wurde für die zytologische Untersuchung auf einen Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und mit Haematoxylin-Eosin gefärbt. Der Rest des Inhalts wurde in 100 µl PBS (Phosphate-buffered saline) aufgenommen. Die Wägung des Proberöhrchens vor und nach der Zugabe der Probe erlaubte die Bestimmung der Menge bzw. der Verdünnung. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20°C tiefgefroren.

5. Zytologische Untersuchung und Beurteilung

Die gefärbten Ausstriche wurden unter dem Mikroskop (Vergrößerung: 10 x 40) beurteilt. Die Einteilung erfolgte nach den von FISCHER (16) beschriebenen Kriterien in folgende vier Klassen:

- E 0: keine Anzeichen einer eitrigen Endometritis
- E 1: leichtgradige eitrige Endometritis
- E 2: mittelgradige eitrige Endometritis
- E 3: hochgradige eitrige Endometritis

6. Proteinbestimmung

Das Gesamteiweiss wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Bradford (BIORAD Laboratories, Richmond, California) bestimmt.

7. Immunelektrophorese

Diese einfache Technik ermöglichte die Trennung der Proteinfractionen, die regelmässig in den Sekretproben vorkamen und leicht zu identifizieren waren.

Die Immunelektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Gel: Agarose-H (LKB Stockholm) 1% in Barbitol-Puffer,

pH 8,6 , bestehend aus:

Natrium-Barbiturat	55,44 g
Diethyl-Barbitursäure	9,94 g
EDTA	20,10 g
Calciumlactat	2,04 g
H ₂ O ad	1800 ml

- Probenmenge: 5 Mikroliter
- Lauf: 3 1/2 Stunden bei 3,5 Volt/cm Gel
- Präzipitation mit folgenden Antiseren (Miles Laboratories, Ind.,USA):
 - Rabitt anti bovine Serum 1:4 verdünnt 100 µl
 - " " " Albumin 1:4 " 100 µl
 - " " " IgG 1:4 " 100 µl
 - " " " IgA 1:2 " 100 µl
- Die Präzipitationsbogen wurden durch Färbung mit Comassie Brilliant Blue R 250 (Fluka AG, Buchs) sichtbar gemacht. Vorgängig wurden die Gele während 24 Stunden in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und danach getrocknet.

8. Radiale Immundiffusion

Zur Bestimmung von IgG und Albumin verwendeten wir die einfache radiale Immundiffusionstechnik nach Mancini. Sie wurde unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

- Gel: Agarose-H (LKB Stockholm) 1% in Barbital-Puffer (siehe oben)
- Antiseren (Miles Laboratories): Anti-Rind-IgG 0,5% (für IgG-Konzentrationen bis 0,7 mg/ml), Anti-Rind-IgG 1,5% (für höhere IgG-Konzentrationen), Anti-Rind-Albumin 1%.
- Referenzseren (Miles Laboratories):
bovines IgG in folgenden Konzentrationen (mg/ml):
1,5 ; 1,25 ; 1,0 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,1 ; 0,05 ; 0,025.
bovines Serumalbumin in folgenden Konzentrationen (mg/ml): 1,25 ; 1,0 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625.
- Probenmenge: 5 Mikroliter
- Diffusionszeit: 48 Stunden
- Die Präzipitatplatten wurden während 24 Stunden gewässert, anschliessend getrocknet und zur besseren Sichtbarmachung der Präzipitatringe mit Comassie Blue R 250 gefärbt.

9. Elektroimmundiffusion

Die IgA-Konzentrationen wurden mit der Elektroimmundiffusionstechnik mittels Hydroxyäthylcellulose-Agarose-Gel (33) bestimmt, und zwar unter folgenden Bedingungen:

- Gel: Agarose-M (LKB, Stockholm) 1% in Barbital-Puffer (siehe oben)
Zugabe von Tylose 0,3% (Merck) und Anti-Rind-IgA (Miles Laboratories) 2%
- Als Standard diente ein Rinder Serum, dessen IgA-Gehalt von Herrn Prof. Dr. Fey, Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Bern, bestimmt wurde.
- Probenmenge: 5 Mikroliter
- Lauf: 24 Stunden bei 2,5 Volt/cm Gel
- Nachpräzipitation während 12 Stunden
- Die Diffusionsplatten wurden während 48 Stunden in B2-Puffer gewässert, getrocknet und die Präzipitations-Peaks mittels Comassie Blue R 250 besser sichtbar gemacht.

C. Resultate

1. Proteine im Uterussekret von gesunden Kühen im Verlauf des Zyklus (Tabelle 1, Abbildung 1)

Die Proben von vier Versuchskühen wurden ausgewertet; diejenigen von vier weiteren konnten nicht berücksichtigt werden und zwar aus folgenden Gründen:

- es konnte zu wenig Probenmaterial entnommen werden
- das Probenmaterial war blutig infolge Schleimhautläsionen am Endometrium, die bei der Probenentnahme entstanden waren
- eine Kuh wies keinen normalen Zyklus auf, das heisst, sie wurde nach drei Wochen nicht wieder rindrig
- bei einer weiteren Versuchskuh ergab die routinemässige mikroskopische Untersuchung des Folmer-Nielsen-Inhalts bei der vorletzten Probe das Vorliegen einer leichtgradigen eitrigen Endometritis.

Eine Probe der verbleibenden vier Kühe wies kein Material auf (Kuh Fi, Probe 4), so dass von dieser Kuh nur vier Proben ausgewertet wurden.

1.1. Mikroskopische Untersuchung der Ausstriche

Die 19 Ausstriche zeigten alle das Bild eines gesunden Endometriums (intakte Epithelzellen, keine oder höchstens vereinzelte Leukozyten) mit den bekannten zyklusbedingten Veränderungen.

1.2. Immunelektrophorese

Um diejenigen Proteinfractionen zu bestimmen, die regelmässig in grösseren Mengen im Uterusschleim vorkommen, führten wir mit einem Teil der Proben von Versuch 1 und 2 Immunelektrophoresen durch, also mit Proben von gesunden Kühen und von solchen mit Endometritis. Zur Identifizierung der Proteine verglichen wir die Präzipitationsbogen mit denjenigen von Rinder Serum. Dabei zeigten sich folgende Resultate:

Regelmässig waren Präzipitationsbogen vorhanden, die dem Albumin und dem IgG-Bogen entsprachen. Bei ungefähr der Hälfte der Proben war ein IgA-Bogen erkennbar. Vereinzelt waren noch bis zu 3 weitere Präzipitate vorhanden, die wir nicht weiter identifizierten. Mit Anti-Albumin, Anti-IgG und Anti-IgA versicherten wir uns, dass es sich bei den vorhandenen Präzipitationsbogen tatsächlich um die drei genannten Proteine handelte.

Somit wählten wir die drei Proteine Albumin, IgG und IgA, deren Gehalt nun mit empfindlicheren Methoden quantitativ bestimmt wurde (vgl. Methodik).

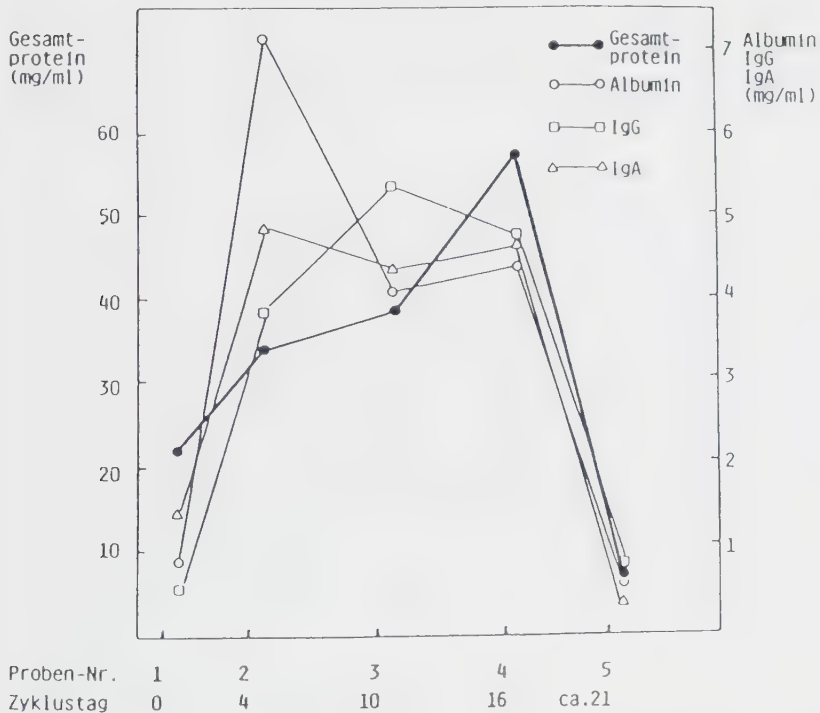
1.3. Gesamtprotein

Die Proteinwerte lagen zwischen 1,0 und 124 mg/ml (Tab. 1); beide Extremwerte stammten von derselben Kuh. Bei den drei anderen Kühen unterschied sich der kleinste vom grössten Wert um einen Faktor 20 bis 30. Tiefe Werte waren im allgemeinen in der Brunst anzutreffen (Ausnahme: Kuh Be, Probe 1), hohe Werte in der Gelbkörperphase (Proben 2 bis 4). Die Maxima lagen zweimal bei der Probe 2 (Be, Fi) und je einmal bei der Probe 3 (Le) bzw. 4 (Bt).

Tabelle 1: Proteine im Verlauf des Zyklus (mg/ml)

		Probe				
		1	2	3	4	5
Kuh						
Gesamt-Protein:	Le	3,0	7,8	61,2	31,2	12,0
	Bt	77,6	45,0	50,2	124,3	1,0
	Be	1,7	37,8	21,7	13,8	7,5
	Fi	2,6	42,9	17,3	---	1,9
Mittelwert		21,2	33,4	37,6	56,4	5,6
Albumin:	Le	0,1	0,1	4,6	2,1	0,6
	Bt	2,9	7,0	7,1	8,8	0,1
	Be	0,1	5,2	3,7	2,0	0,8
	Fi	0,1	16,1	0,7	---	0,5
Mittelwert		0,8	7,1	4,0	4,3	0,5
IgG:	Le	0,3	0,5	6,5	5,7	1,0
	Bt	1,3	6,5	7,8	8,1	0,4
	Be	0,1	4,9	1,7	0,3	0,8
	Fi	0,2	3,2	5,3	---	0,5
Mittelwert		0,5	3,8	5,3	4,7	0,7
IgA:	Le	0,4	---	5,4	10,9	0,6
	Bt	2,9	9,0	5,9	2,8	0,3
	Be	---	0,6	0,7	0,1	---
	Fi	0,9	---	5,2	---	0,1
Mittelwert		1,4	4,8	4,3	4,6	0,3

ABBILDUNG 1: Proteine im Verlauf des Zyklus
(Durchschnittswerte)



Dies ergab relativ einheitliche Kurven mit einem markanten Anstieg nach der Brunst und einem mehr oder weniger deutlichen Abfall am Ende des Zyklus (Abb.1). Vergleicht man den Durchschnittswert in der Brunst (13,5 mg/ml) mit dem Durchschnittswert aller Diöstrusproben (41,2 mg/ml), so unterschieden sie sich um mehr als den Faktor 3.

Die durchschnittliche Zunahme des Proteingehaltes von der Östrusphase (Mittelwerte der Proben 1 und 5) zur Diöstrusphase (Proben 2 bis 4) war hoch signifikant ($p < 0,01$).

1.4. Albumin, IgG und IgA

Der Konzentrationsverlauf der drei Proteine zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 1): Parallel zum Totaleiweiss stiegen die Konzentrationen nach der Brunst an und sanken wieder ab gegen die nächste Brunst. Mengenmässig unterschieden sich Albumin und IgG nicht wesentlich voneinander. Die IgA-Werte lagen zum Teil in derselben Grössenordnung, bei anderen Proben waren sie bis achtmal niedriger als Albumin und IgG (Be 2, Fi 5). Bei 4 Proben wurden keine messbaren IgA-Konzentrationen gefunden (Fi 2, Be 1 und 5, Le 2). Auch bei den einzelnen Proteinfractionen erwiesen sich die durchschnittlichen Veränderungen vom Östrus zum Diöstrus als signifikant ($p < 0,01$).

1.5. Prozentuale Anteile von Albumin, IgG und IgA am Totaleiweiss

Hier musste berücksichtigt werden, dass das Gesamteiweiss und die drei Fraktionen mit unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden. Methodisch bedingte Abweichungen von den effektiv vorhandenen Verhältnissen waren daher nicht auszuschliessen, wenn die drei Fraktionen, einzeln oder kombiniert, mit dem Totaleiweiss verglichen wurden.

Der prozentuale Anteil der verschiedenen Fraktionen liess keine zyklusabhängigen Veränderungen erkennen. Beim Vergleich der Werte, die einem bestimmten Zyklustag entsprachen, zeigten sich zum Teil beträchtliche Unterschiede zwischen den vier Versuchskühen. Über den gesamten Zyklus gesehen unterschied sich keine Kuh wesentlich von den andern. Die einzelnen Anteile von Albumin, IgG und IgA am Totaleiweiss betrugen meistens weniger als 20%; in jeder Verlaufs-

kurve gab es einzelne Werte, die zwischen 30 und 40% lagen. Die Anteile der Summe der drei Proteine am Totaleiweiss lagen zwischen 7 und 80%.

2. Proteine im Uterussekret von Kühen im Verlauf einer experimentellen Endometritis (Tabelle 2, Abbildung 2)

Der Versuch 2 sollte zeigen, wie sich die Eiweisskonzentrationen im Verlauf einer Endometritis ändern. Um möglichst einheitliche Bedingungen zu haben, wurde die Endometritis experimentell induziert. Auf der Suche nach einem geeigneten Agens stiessen wir auf die Endotoxine. Ein erster Vorversuch hatte gezeigt, dass die intrauterine Applikation von *E. coli*-Endotoxin in einer Dosierung von 50 bis 100 µg eine akute, eitrige Endometritis ohne Störung des Allgemeinbefindens hervorrief, die innerhalb weniger Tage wieder abgeklungen war. Bei 8 Kühen wurde in der frühen Progesteronphase (4. bis 8. Zyklustag) die Kontrollprobe entnommen und anschliessend 100 µg Endotoxin ins Corpus uteri infundiert. Wir wählten diese Zyklusphase, um zyklusbedingte Schwankungen der Proteinkonzentrationen möglichst zu umgehen. Fünf Kühe gelangten in die Auswertung; die restlichen drei konnten aus folgenden Gründen nicht berücksichtigt werden:

- bei einer Kuh hatte die Endotoxininfusion nicht zu einer Endometritis geführt.
- bei 2 Kühen war bei einzelnen Proben zuwenig Material gewinnbar gewesen, oder dieses war zu stark mit Blut kontaminiert.

2.1. Zytologie

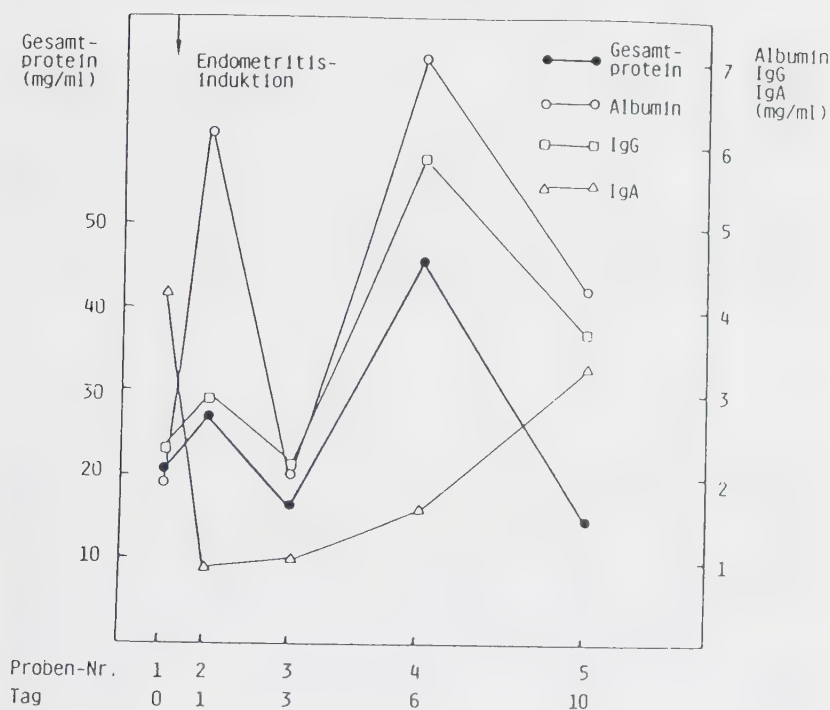
Die Probe 1 (Ausgangswert vor der Endometritisinduktion) zeigte bei keiner der 5 Kühe Anzeichen einer Endometritis (Tab. 2). Ein Tag nach der Endometritisinduktion (Proben 2) wiesen alle Kühe eine Endometritis auf. Vier von ihnen hatten eine mittel- bis hochgradige Endometritis (E 2 bzw. E 3), bei einer Kuh (Be) zeigten sich nur leichtgradige Veränderungen (E 1).

Nach 2 weiteren Tagen (Proben 3) ergab sich folgendes Bild: Vier Kühe wiesen noch eine Endometritis auf; bei zwei von ihnen lag derselbe Endometritisgrad vor wie bei der Probe 2, bei den andern zeigten sich weniger starke Veränderungen.

Tabelle 2: Endometritisgrad und Proteine (mg/ml) im Verlauf einer induzierten Endometritis

		Probe				
		1	2	3	4	5
Kuh						
Endometritisgrad:	Le	E 0	E 3	E 1	E 0	E 0
	Ed	E 0	E 3	E 2	E 0	E 0
	Be	E 0	E 1	E 1	E 0	E 0
	Fi	E 0	E 2	E 2	E 0	E 0
	Pa	E 0	E 2	E 0	E 0	E 0
Gesamtprotein:	Le	24,1	29,3	16,3	13,5	31,0
	Ed	28,0	28,2	11,0	47,5	6,3
	Be	21,1	14,1	19,1	146,9	6,3
	Fi	9,8	44,1	3,3	10,1	19,2
	Pa	20,1	19 2	30,6	9,9	9,5
Mittelwert		20,6	27,0	16,1	45,6	14,5
Albumin:	Le	0,9	4,0	1,1	0,7	7,3
	Ed	3,2	3,4	2,2	15,0	0,6
	Be	1,0	5,2	2,6	14,0	1,3
	Fi	0,3	5,4	0,3	3,5	10,0
	Pa	4,0	12,4	3,7	1,3	1,9
Mittelwert		1,9	6,1	2,0	7,0	4,2
IgG:	Le	2,9	3,3	1,9	0,9	5,7
	Ed	3,0	3,4	1,4	10,4	0,4
	Be	2,5	2,3	4,2	13,9	1,2
	Fi	0,7	1,9	0,4	2,5	9,3
	Pa	2,5	3,7	2,7	1,4	1,9
Mittelwert		2,3	2,9	2,1	5,8	3,7
IgA:	Le	1,8	0,6	1,1	0,5	8,6
	Ed	0,3	1,2	0,3	1,6	---
	Be	7,5	0,1	2,2	1,9	0,2
	Fi	6,3	0,9	0,5	1,0	0,1
	Pa	5,2	1,6	0,8	2,9	4,3
Mittelwert		4,2	0,9	1,0	1,6	3,3

ABBILDUNG 2: Proteine im Verlauf einer induzierten Endometritis (Durchschnittswerte)



Bei einer Kuh wurden bereits keine entzündlichen Veränderungen mehr gefunden. Die 4. und 5. Proben liessen bei keiner Kuh mehr Anzeichen einer Endometritis erkennen; somit war diese sechs Tage nach der Induktion wieder vollständig abgeklungen.

Die Einteilung in die verschiedenen Endometritisgrade erfolgte vorwiegend aufgrund der Menge der Leukozyten. Im Zellbild dominierten die neutrophilen Granulozyten; vereinzelt kamen Makrophagen und Lymphozyten vor. Verglichen mit Ausstrichen von Patienten mit chronischer Endometritis fiel auf, dass die Epithelzellen auch bei hochgradiger Leukozytenimmigration grösstenteils intakt waren; Zelldetritus, wie er häufig in Ausstrichen von Kühen mit hochgradiger Endometritis gefunden wird, konnten wir bei den Versuchskühen nie sehen.

2.2. Gesamtprotein

Die Ausgangswerte (Proben 1) lagen zwischen 10 und 30 mg/ml (Tab. 2) und entsprachen somit den Werten von Versuch 1 in der Diöstrusphase. Die Resultate der Proben 2 bis 5 ergaben kein einheitliches Bild: Die Proteinkonzentrationen schwankten bei allen Kühen um den Wert der 1. Probe, ohne dass sich eine Gesetzmässigkeit erkennen liess (Abb. 2). Die Werte der Proben 2 lagen nahe beim Ausgangswert, wobei die Differenzen zu diesem bei 4 Kühen weniger als 7 mg bzw. weniger als 30% betrugen. Für die Proben 3 bis 5 ergaben sich etwas grössere Schwankungen und zwar nach beiden Seiten.

2.3. Albumin, IgG und IgA

Wie bei Versuch 1 verliefen die Kurven für Albumin und IgG grösstenteils parallel (Abb. 2). Mit einer Ausnahme (IgG, Kuh Be) stiegen die Konzentrationen beider Proteine von der ersten zur zweiten Probe; ausgeprägter war dieser Anstieg beim Albumin. Bei 4 Kühen betrug er das 3- bis 18-fache. Umgekehrt verhielten sich die IgA-Werte: Mit einer Ausnahme (Kuh Ed) sanken die IgA-Konzentrationen von der Probe 1 zur Probe 2 um das 3- bis 50-fache. Im weiteren verliefen die Kurven aller drei Proteine ungefähr parallel zum Gesamtprotein. Statistisch wurde geprüft, ob der mittlere Unterschied zwischen der ersten Probe (Ausgangswert) und der zweiten Probe (1 Tag nach der Endometritisinduktion) von Null ver-

schieden war. Die Albuminkonzentrationen der 2. Proben erwiesen sich dabei als signifikant grösser als diejenigen der Kontrollproben ($p < 0,05$). Die Unterschiede bei Gesamtprotein, IgG und IgA waren nicht signifikant.

2.4. Relative Anteile der Proteinfractionen

Wie im Versuch 1 liessen die prozentualen Anteile der einzelnen Proteine zum Gesamteiweiss keine relevanten Unterschiede erwarten. Wir beschränkten uns daher auf das Verhältnis von IgA zu Albumin, da sich die Verlaufskurven dieser zwei Proteine am meisten unterschieden. Bei den Kontrollproben (2/1) fiel auf, dass bei vier Kühen mehr IgA als Albumin vorhanden war; bei der Kuh Fi betrug der IgA-Wert das 20fache des Albuminwertes, bei der Kuh Be etwa das 8fache. Diese hohen Quotienten kamen zustande, weil beide Kühe zu diesem Zeitpunkt sehr hohe IgA-Konzentrationen bei gleichzeitig tiefen Albuminwerten aufwiesen. Bei vier von fünf Kühen kam es von der ersten zur zweiten Probe, also innerhalb eines Tages nach der Endotoxinapplikation, zu einem markanten Abfall des Quotienten IgA:Albumin, bei zwei Kühen um mehr als das hundertfache. Alle fünf Quotienten lagen bei der Probe 2 unter 0,4; der kleinste betrug 0,03, das heisst, dass ein Tag nach der Endometritisinduktion die Albuminkonzentrationen 3 bis 30mal höher waren als diejenigen von IgA. Die Paardifferenzen unterschieden sich allerdings nicht signifikant von Null. Bei den Proben 3 bis 5 (3, 6 und 10 Tage nach der Endometritisinduktion) lagen die Werte wieder etwas höher, wobei die Streuungen grösser waren als bei den zweiten Proben.

3. Proteine im Uterussektret von Kühen mit chronischer Endometritis in Abhängigkeit vom Zyklus (Tabelle 3)

Es wurden nur solche Kühe in den Versuch genommen, bei denen Anamnese und klinische Befunde eine zuverlässige Zyklusdiagnose ergaben und welche einer der beiden Gruppen (Pro-) Östrus (3a) und Diöstrus (3b) zugeordnet werden konnten. Einige Proben wurden wegen Blutbeimengung nicht berücksichtigt. Total 24 Proben wurden ausgewertet, davon stammten 14 von Kühen in der Östrogenphase und 10 von solchen in der Progesteronphase.

Tabelle 3: Proteine bei chronischer Endometritis 1., 2. und 3. Grades (3a: Östrus/Proöstrus; 3b: Diöstrus) (mg/ml)

		Gesamt- protein	Albumin	IgG	IgA
3a:	E 1:	24,2	8,5	8,6	1,7
		39,2	10,1	4,6	0,8
		16,5	0,2	5,1	0,7
		37,4	7,4	5,1	1,1
	Mittelwert	29,3	6,5	5,8	1,1
	E 2:	5,9	1,1	1,2	0,3
		15,1	4,7	2,8	0,7
		13,9	3,3	8,0	0,4
		10,8	0,7	1,9	0,6
		3,5	0,8	1,2	0,6
	Mittelwert	9,8	2,1	3,0	0,5
	E 3:	32,2	6,6	6,8	0,8
		13,7	2,4	1,9	0,2
		38,8	3,5	2,9	1,9
		36,0	11,2	8,8	1,5
		23,2	1,6	2,3	0,8
	Mittelwert	28,8	5,1	4,5	1,0
	Gesamtmittelwert	22,2	4,4	4,4	0,9

Tabelle 3 (Fortsetzung)

		Gesamt- protein	Albumin	IgG	IgA
3b:	E 1:	86,8	0,3	7,8	4,2
		11,2	3,4	6,2	1,2
	Mittelwert	49,0	1,8	7,0	2,7
	E 2:	30,9	12,3	7,9	1,0
		28,8	6,7	4,3	1,3
		13,9	2,9	3,1	1,5
	Mittelwert	24,0	7,3	5,1	1,3
	E 3:	20,2	16,8	4,8	4,6
		33,5	4,8	1,9	1,5
		39,1	6,5	5,7	0,1
	Mittelwert	30,9	9,4	4,1	2,0
	Gesamtmittelwert	33,0	6,7	5,2	1,9

Über die Anzahl Proben pro Endometritisgrad gibt Tabelle 4 Auskunft:

Tabelle 4: Anzahl Proben pro Endometritisgrad (Versuch 3)

	E 1	E 2	E 3
3a (Pro-)östrus)	4	5	5
3b (Diöstrus)	2	3	5
Total	6	8	10

3.1. Gesamtprotein

Die durchschnittlichen Proteinwerte betrugen 22,2 mg/ml (3a) und 33,0 mg/ml (3b) (Tab. 3). Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Verglichen mit den gesunden Kühen (Versuch 1) waren die meisten Werte der (Pro-)östrus-Proben deutlich höher, während bei den Diöstrus-Proben eher die gesunden Kühe höhere Eiweisskonzentrationen aufwiesen. Beide Unterschiede waren allerdings nicht signifikant, bedingt durch die grosse Streuung. Somit hatten bei den Endometritis-Kühen zyklusbedingte Veränderungen eher einen geringeren Einfluss auf den Proteingehalt als bei gesunden Kühen.

3.2. Albumin, IgG und IgA

Bei allen drei Proteinen waren die Durchschnittswerte vom Versuch 3b etwas grösser als vom Versuch 3a (Albumin: 4,4 bzw. 6,7 mg/ml; IgG: 4,4 bzw. 5,2 mg/ml; IgA: 0,9 bzw. 1,9 mg/ml) (Tab. 3); die Differenzen lagen in derselben Grössenordnung wie beim Gesamteiweiss. Sie dürften ebenfalls durch die Schwankungen im Verlauf des Zyklus bedingt sein. Der Vergleich mit den gesunden Kühen zeigte folgendes:

- Gesunde Kühe in Brunst hatten meist niedrigere Albumin- und IgG- Werte, während beim IgA kein Unterschied bestand.
- Endometritis-Kühe im Diöstrus unterschieden sich nicht von gesunden bezüglich Albumin und IgG. Die IgA-Werte waren dagegen eher niedriger bei den kranken Kühen.

Wie beim Totaleiweiss waren auch hier die aufgezeigten Unterschiede nicht signifikant.

3.3. Vergleich der Proben mit demselben Endometritisgrad

Mit einer Ausnahme (Albumin, 3b) konnten zwischen den E 1 - und den E 3 - Kühen bei keinem Parameter Unterschiede festgestellt werden (Tab. 3). Die sich entsprechenden Mittelwerte lagen in derselben Grössenordnung. Die Werte der E 2-Kühe waren eher etwas tiefer als diejenigen der E 1- und der E 3-Kühe. Einzig beim Albumin im Versuch 3b liess sich die Tendenz einer Zunahme der Konzentration mit höherem Endometritisgrad erkennen (Durchschnittswerte: E 1: 1,8 mg/ml, E 2: 7,3 mg/ml, E 3: 9,4 mg/ml); wegen des geringen Probenumfanges und der grossen Streuung ist diesem Einzelbefund jedoch keine Bedeutung zuzumessen. Somit bestanden keine Unterschiede in der Proteinzusammensetzung in Abhängigkeit vom Endometritisgrad.

IV DISKUSSION

Die Interpretation der vorliegenden Resultate wird erschwert durch die grosse Streuung innerhalb der verschiedenen Parameter. Gründe dafür sind vor allem in der Beschaffenheit des Probenmaterials und in der Methodik zu suchen. Uterusschleim ist ein sehr visköses, manchmal inhomogenes Material, das mit dem Folmer-Nielsen-Katheter häufig nur in sehr kleinen Mengen gewinnbar ist. Die hohe Viskosität wirkte sich erschwerend aus auf die Applikation einer exakten Probenmenge auf die verschiedenen Testplatten. Kann das Material nicht sofort nach der Entnahme verarbeitet werden, so ist mit einer gewissen Eintrocknung zu rechnen, da sich die Katheter nicht luftdicht verschliessen lassen. Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Blutkontamination der Proben. Auch bei vorsichtiger Manipulation kann es bei der Probenentnahme zu Schleimhautläsionen mit Blutungen kommen. Für die vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch keine geeignetere Methode zur Gewinnung der Uterussekrete gefunden werden. Mehrere Autoren entnahmen die Proben aus dem eröffneten Uterus frisch geschlachteter Tiere (9, 12, 31, 32). LAMOTHE et al. (24) aspirierten die Uterussekrete mit einem Katheter, der an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Mit dieser Methode, die erstmals von FAHNING et al. (15) beschrieben worden war, konnten zwar grössere Sekretmengen gewonnen werden als mit dem Folmer-Nielsen-Katheter; mit dem Einführen des Katheters ins Uteruslumen und mit dem Erzeugen eines Vakuums dürfte aber ebenfalls eine Reizwirkung verbunden sein. Das gleiche gilt für die Spülproben, die mit einem in den Uterus eingeführten Tubus unter rektaler Massage gewonnen wurden (19).

Beim Vergleich der Proteine untereinander und mit dem Totaleiweiss muss berücksichtigt werden, dass zu deren Bestimmung unterschiedliche Methoden angewendet wurden. Kleinere Fehler können daher methodisch bedingt sein.

Der Proteingehalt im Uterussekret ist im Verlauf des Sexualzyklus beträchtlichen Schwankungen unterworfen: Parallel mit dem Totaleiweiss steigen die drei untersuchten Proteine Albumin, IgG und IgA nach der Brunst an und sinken gegen das Zyklusende wieder ab. In der Progesteronphase liegen somit

höhere Konzentrationen vor als im Östrus. Dieser Unterschied kann allein bedingt sein durch den geringeren Wassergehalt des Diöstrusschleimes und der damit verbundenen Konzentration der darin gelösten Stoffe. Möglicherweise spielen aber auch spezifische Transportmechanismen von Proteinen ins Uteruslumen eine Rolle, wie sie verschiedentlich beschrieben wurden (5, 21, 34). Für die Hypothese des einfachen Konzentrationsphänomens spricht allerdings die Tatsache, dass sich die mengenmässigen Anteile der einzelnen Proteine im Verlauf des Zyklus nicht wesentlich ändern. Zu diesem Schluss kommen auch DUNCAN et al. (13) aufgrund der engen Korrelation von IgG und Serumalbumin im Vaginalsekret.

Die mengenmässig bedeutendsten Proteine im Uterusschleim des Rindes sind Albumin, IgG und IgA. Während Albumin und IgG in allen Proben nachgewiesen werden konnten, wurde bei gesunden Kühen in fünf von zwanzig Proben kein IgA gefunden. Die drei Proteine machen bis zu 80 % des Totaleiweisses aus.

Im Blutserum ist die gesamte Gammaglobulinfraktion annähernd so gross wie die Albuminfraktion (16-32 mg/ml bzw. 21-36 mg/ml) (6). Im Uterusschleim dagegen sind etwa doppelt so viel Gammaglobuline wie Albumin vorhanden. Der Unterschied kommt vor allem durch die hohen IgA-Konzentrationen im Uterusschleim zustande: Während in unseren Proben der Anteil von IgA am Totalprotein bis zu 35 % ausmachte, beträgt im Serum der IgA-Anteil am Gesamteiweiss nur 0,1 bis 1 %. In diversen Arbeiten fand man ebenfalls hohe IgA-Konzentrationen in den Genitalsekreten des Rindes, und zwar nach lokaler Infizierung mit *C. fetus* (10, 13, 35). Die lange Persistenz dieser Antikörper wurde von CORBEIL et al. (10) nachgewiesen. Somit wäre denkbar, dass gesunde Kühe mit hohen IgA-Werten vor kürzerer oder längerer Zeit eine Uterusinfektion durchgemacht haben. Dies erklärt aber nicht, warum bei drei von vier Kühen innerhalb weniger Tage niedrige und hohe relative IgA-Werte aufgetreten sind (Kühe Le, Bt und Fi).

Im zweiten Versuch konnte gezeigt werden, dass mit lokaler Applikation von Endotoxinen eine akute eitrige Endometritis hervorgerufen wird, die innerhalb weniger Tage wieder abklingt. Mehrere Autoren haben die Wirkung der Endotoxine am Euter untersucht (20, 27). In Abhängigkeit von der Dosierung bewirkte die intramammäre Applikation eine mehr oder weniger hochgradige akute Mastitis mit oder ohne Störung des Allge-

meinbefindens. ELMORE et al. (14) haben Endotoxine bei Schafen intauterin infundiert, und zwar in der hohen Dosierung von 100 mg, ohne dass die Tiere Allgemeinstörungen zeigten. Es erfolgte keine Resorption der Endotoxine aus dem Uterus in den Kreislauf. Auch bei unseren Tieren konnte keine systemische Wirkung der Endotoxine festgestellt werden.

FREDRIKSSON et al. (17) zeigten, dass die intrauterine Applikation von Endotoxin bei Ziegen keinen Einfluss auf die Länge des Sexualzyklus hatte.

Die Endotoxin-induzierte akute Endometritis bewirkte eine vermehrte Sekretion ins Uteruslumen, die in der Regel zu klinisch erkennbarem eitrigem Genitalausfluss führte. Die Totaleiweisskonzentration änderte sich dabei nicht. Hingegen wurden ein Tag nach der Endometritisinduktion signifikant höhere Albuminkonzentrationen gemessen. Vermutlich sind diese bedingt durch die leichtere Permeabilität von Albumin aufgrund des kleineren Molekulargewichtes. Während die IgG-Werte ebenfalls leicht erhöht waren, kam es bei vier von fünf Kühen zu einem markanten Abfall der IgA-Konzentration. Dies dürfte durch die Verdünnung des IgA-reichen Uterusschleimes mit Blutserum zustandekommen.

Im Hinblick auf allfällige praktische Anwendungsmöglichkeiten interessieren in erster Linie die Resultate von Versuch 3. Diese zeigen nun aber, dass es aufgrund der hier untersuchten Parameter kaum möglich ist, gesunde Kühe von Endometritiskühen zu unterscheiden. Gar keine Unterschiede konnten zwischen Kühen mit verschiedenem Endometritisgrad festgestellt werden. Die beobachteten Differenzen zwischen gesunden und kranken Kühen sind zu klein, als dass die Werte einer einzelnen Kuh einer der beiden Gruppen zugeordnet werden könnten. Der Versuch 3 zeigt lediglich gewisse Tendenzen auf, etwa die erhöhten Protein-, Albumin- und IgG-Werte bei Endometritiskühen in Brunst. Erst beim Vergleich grosser Tiergruppen könnten sich einzelne Parameter möglicherweise signifikant unterscheiden.

Die chronische Endometritis des Rindes ist primär bakteriell bedingt, wenn auch im weiteren Verlauf häufig keine Erreger mehr nachweisbar sind (18a). Es hätte angenommen werden können, dass die Immunglobuline, speziell IgA, bei chronischer Endometritis erhöht wären, wie dies nach experimentel-

ler Infizierung des Uterus mit *C. fetus* der Fall ist (9, 10, 13, 35). Unsere Resultate stehen auch im Gegensatz zu dem, was in Analogie zur Stute hätte erwartet werden können. Mehrere Autoren fanden signifikant höhere Immunglobulinwerte, speziell IgA, bei Endometritisstuten im Vergleich zu gesunden Stuten (2, 29, 36).

Möglicherweise ist die Art und das Ausmass der Immunantwort auf uterine Infektionen von weiteren Faktoren abhängig, die hier nicht untersucht worden sind, etwa von der Art der Infektionserreger und von der Persistenz der Infektion.

Ob mit Hilfe weiterer Parameter, etwa mit dem Nachweis gewisser Entzündungsmediatoren oder Leukozyten-Stoffwechselprodukte, das Ausmass einer Endometritis quantitativ bestimmt werden könnte, müssten weitere Untersuchungen zeigen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Uterussekrete von gesunden Kühen, von Kühen mit experimentell induzierter Endometritis und von solchen mit chronischer Endometritis wurden untersucht. Bestimmt wurden Gesamtprotein, Albumin, IgG und IgA. Diese drei Proteine konnten regelmässig in grösseren Mengen nachgewiesen werden. Bei vier gesunden Kühen wurden die Proteinkonzentrationen im Verlauf des Zyklus bestimmt. Sie wiesen neben grossen individuellen Schwankungen generell höhere Konzentrationen aller Parameter im Diöstrus als im Östrus auf.

Bei fünf Kühen wurde mit intrauteriner Applikation von E. coli-Endotoxin eine akute Endometritis induziert. Dabei kam es innerhalb von 24 Stunden zu einem Abfall der IgA-Konzentration und gleichzeitig zu einem Anstieg von Albumin und IgG, während sich das Gesamtprotein nicht veränderte.

Die Uterussekrete von 24 Kühen mit chronischer Endometritis unterschieden sich nicht wesentlich von denjenigen gesunder Kühe. Die Differenzen zwischen den in der Brunst und im Diöstrus gemessenen Werten waren hier weniger gross, bedingt durch die im Vergleich zu den gesunden Kühen etwas höheren Östrus-Werte. Eine Einteilung in verschiedene Endometritis-grade war anhand der untersuchten Parameter nicht möglich.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ASBURY, A.C., K.T.SCHULTZ, P.H.KLESZIUS, G.W.FOSTER and S.M.WASHBURN (1982)
Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus
J.Reprod.Fert., Suppl. 32, 151-159
- 2 ASBURY, A.C., R.E.W.HALLIWELL, G.W.FOSTER and S.J.LONGINO (1980)
Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis
Theriogenology 14, 299-308
- 3 BEIER, H.M. (1976)
Uterine secretion protein pattern under hormonal influences
Current Topics in Pathology 62, 105-120
- 4 BEIER, H.M., W.KUEHNEL and G.PETRY (1971)
Uterine secretion proteins as extrinsic factors in preimplantation development
Advances in the Biosciences 6, 165-189
- 5 BEIER, H.M. and K.BEIER-HELLWIG (1973)
Specific secretory proteins of the female genital tract
Acta Endocrinol., Suppl. 180, 404-425
- 6 BLOOD, D.C., O.M.RADOSTITS and J.A.HENDERSON (1983)
Veterinary Medicine
Baillière Tindall, London
- 7 BLUE, M.G., A.A.BRADY, J.N.DAVIDSON and R.M.KENNEY (1982)
Studies on the composition and antibacterial activity of uterine fluid from mares
J.Reprod.Fert., Suppl. 32, 143-149
- 8 BUTLER, J.E., C.A.KIDDY, C.F.MAXWELL, M.B.HYLTON and R.ASOFSKY (1971)
Synthesis of immunoglobulins by various tissues of the cow
J.Dairy Sci. 54, 1323-1324

- 9 CORBEIL, L.B., J.R.DUNCAN, G.D.SCHURIG, C.E.HALL and A.J.WINTER (1974)
Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum
Infect.Immunity 10, 1084-1090

- 10 CORBEIL, L.B., G.D.SCHURIG, J.R.DUNCAN, B.N.WILKIE and A.J.WINTER (1981)
Immunity in the female bovine genital tract based on the response to "Campylobacter fetus"
Advances in experimental Medicine and Biology 137, 729-743

- 11 DANIEL, J.C., Jr. (1971)
Uterine proteins and embryonic development
Advances in the Biosciences 6, 191-203

- 12 DIXON, S.N. and R.A.GIBBONS (1979)
Proteins in the uterine secretions of the cow
J.Reprod.Fert. 56, 119-127

- 13 DUNCAN, J.R., B.N.WILKIE, F.HIESTAND and A.J.WINTER (1972)
The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterisation and quantitation
J.Immun. 108, 965-976

- 14 ELMORE, R.G., T.A.MOLLETT, J.N.BERG and D.A.SCHMIDT (1983)
Escherichia coli endotoxin absorption from the ewe's uterus and peritoneal cavity
Theriogenology 119, 841-847

- 15 FAHNING, M.L., R.H.SCHULTZ and E.F.GRAHAM (1966)
A technique for collection of uterine fluids from the live cow
Vet.Rec. 79, 230-233

- 16 FISCHER, W. (1977)
Vergleichende Untersuchungen bei Rindern mit und ohne Endometritis unter besonderer Berücksichtigung von Schleimhautabstrichen
Diss.Universität Zürich, Vet.Med.Fakultät

- 17 FREDRIKSSON, G., H.KINDAHL and L.EDQVIST (1985)
Endotoxin-induced prostaglandin release and corpus luteum
function in goats
Animal Reprod.Sci. 8, 109-121
- 18 GRUNERT, E. und M.BERCHTOLD (1982)
Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind
Paul Parey, Berlin und Hamburg
- 18a BERCHTOLD, M. (1982)
Uteruserkrankungen
In 18
- 19 HEAP, R.B. (1962)
Some chemical constituents of uterine washings: a method
of analysis with results from various species
J.Endocrin. 24, 367-378
- 20 JAIN, N.C., O.W.SCHALM and J.LASMANIS (1978)
Neutrophil kinetics in endotoxin-induced masitis
Am.J.Vet.Res. 39, 1662-1667
- 21 KELLY, J.K. and H.FOX (1979)
The local immunological defense system of the human
endometrium
J.Reprod.Immun. 1, 39-45
- 22 KENNEY, R.M. and S.A.KHALEEL (1975)
Bacteriostatic activity of the mare's uterus: a progress
report on immunoglobulins
J.Reprod.Fert., Suppl. 23, 357-358
- 23 KIRCHNER, C. (1979)
Immunohistochemical localization of secretory proteins
in the endometrial epithelium of the rabbit
Cell Tissue Res. 199, 25-36
- 24 LAMOTHE, P., P.GUAY, M.IBRAHIM and A.TREMBLAY (1972)
Les protéines totales et leurs fractions dans le sérum et
dans les sécrétions endométriales chez la vache atteinte
d'infertilité sine materia
Can.J.comp.Med. 36, 94-98

- 25 LIU, I.K.M., G.MITCHELL, L.E.PERRYMAN and E.W.STEWART (1981)
Immunological defense mechanisms of the uterus in the mare
Proc.Soc.Theriogenology, 265-267
- 26 MANSER, H. und M.BERCHTOLD (1975)
Untersuchungen über die Eignung von Schleimhautabstrichen
zur Diagnose der chronischen Endometritis des Rindes
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 88, 41-44
- 27 MCKENZIE, W.N., Jr. and R.R.ANDERSON (1981)
Endotoxin induced migration of leukocytes from blood to
milk
J.Dairy Sci. 64, 227-235
- 28 MILLER, J.G. (1951)
A technique of endometrial biopsy in the bovine animal
J.Amer.Vet.Med.Ass. 119, 368-370
- 29 MITCHELL, G., I.K.M.LIU, L.E.PERRYMAN, G.H.STABENFELDT
and J.P.HUGHES (1982)
Preferential production and secretion of immunoglobulins
by the equine endometrium - a mucosal immune system
J.Reprod.Fert., Suppl. 32, 161-168
- 30 ROBERTS, G.P., J.M.PARKER and S.R.HENDERSON (1976)
Proteins in human uterine fluid
J.Reprod.Fert. 48, 153-157
- 31 ROBERTS, G.P. and J.M.PARKER (1974)
Macromolecular components of the luminal fluid from the
bovine uterus
J.Reprod.Fert. 40, 291-303
- 32 ROBERTS, G.P. and J.M.PARKER (1974)
An investigation of enzymes and hormone-binding proteins
in the luminal fluid of the bovine uterus
J.Reprod.Fert. 40, 305-313
- 33 SCHULLER, E., M.LEFEVRE and L.TÖMPE (1972)
Elektroimmunodiffusion of α_2 M, IgA and IgM in
nanogram quantities with a hydroxyethylcellulose-
agarose gel: application to unconcentrated CSF
Clin.Chim.Acta 42, 5-13

- 34 VOSS, H.J., and M.BEATO (1977)
Human uterine fluid proteins: gel electrophoretic pattern
and progesterone-binding properties
Fertility and Sterility 28, 972-980
- 35 WILKIE, B.N., J.R.DUNCAN and A.J.WINTER (1972)
The origin, class and specificity of immunoglobulins in
bovine cervico-vaginal mucus: variation with parenteral
immunization and local infection with *Vibrio fetus*
J.Reprod.Fert. 31, 359-365
- 36 WILLIAMSON, P., A.DUNNING, J.O'CONNOR and W.J.PENHALE (1983)
Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline
phosphatase activity in uterine flushings from mares with
endometritis
Theriogenology 19, 441-448

Dank

An dieser Stelle möchte ich allen, die mir bei der Realisierung dieser Arbeit geholfen haben, herzlich danken, insbesondere

Herrn Prof. Dr. M. Berchtold für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung,

Herrn Dr. U. Gassmann für seinen grossen Einsatz bei der Erarbeitung der Labormethoden und bei der Lösung technischer Probleme und

Frau M. Nussbaumer für die exakte Durchführung der Laboruntersuchungen.

Lebenslauf

Urs Rufener, geboren am 7. November 1954 in Zürich

1962-1968 Primarschule in Horgen

1968-1974 Kantonsschule Freudenberg in Zürich,
Matura Typus B

1975-1980 Studium der Veterinärmedizin an der
Universität Zürich,
Staatsexamen im Herbst 1980

1981-1982 Assistent bei Dr. med. vet. H. Spengler,
Uzwil

seit 1982 Assistent an der Klinik für Geburtshilfe
und Gynäkologie der Haustiere mit Ambula-
torium der Universität Zürich

